

ОТЗЫВ НА АВТОРЕФЕРАТ

диссертации Полохова Дмитрия Михайловича «Диагностика нарушений функции тромбоцитов у детей с использованием метода проточной цитометрии», представленной на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 3.1.28. «Гематология и переливание крови».

Диссертационная работа Полохова Дмитрия Михайловича посвящена исследованию тромбоцитов у детей с генетическими нарушениями тромбоцитарного гемостаза с помощью метода проточной цитометрии. Отдельные формы наследственных заболеваний тромбоцитов (НЗТ) встречаются достаточно редко (не более нескольких случаев на 1 млн. населения), однако эта группа включает несколько десятков нозологий и таким образом составляет значимую когорту пациентов, в том числе с тяжелыми геморрагическими проявлениями. В течение многих лет диагностика НЗТ основывалась на изучении анамнеза, микроскопическом исследовании тромбоцитов и специальных лабораторных тестах, таких как измерение агрегации тромбоцитов, стимулированной различными индукторами, измерение секреции из гранул и некоторые другие. Однако в последние годы для анализа нарушений тромбоцитов все чаще применяется метод проточной цитометрии. Важное достоинство этого метода - возможность проведения исследований в небольших объемах крови и при низком содержании тромбоцитов, что особенно критично при исследовании больных детского возраста и больных с тромбоцитопениями. Кроме того, метод позволяет анализировать большое число параметров, описывающих свойства тромбоцитов: их размер (показатель светорассеивания), уровень экспрессии различных белков в покое и после активации, экзоцитоз внутриклеточных гранул, появление на поверхности фосфатидилсерина, обеспечивающего коагуляционную активность тромбоцитов. В настоящем исследовании именно этот подход был использован автором для характеристики изменений структуры и функции тромбоцитов, обусловленных различными генетическими дефектами. Таким образом работа является актуальной по подбору включаемых в исследование пациентов и по выбору современного, высокоинформативного метода исследования.

В исследование был включен 191 пациент детского возраста с нарушениями тромбоцитарного гемостаза и 42 здоровых ребенка сопоставимого возраста. Кроме больных с НЗТ (n = 101) в исследование было также включено 40 детей с тромбоцитозами, обусловленными соматическими мутациями (эссенциальная тромбоцитемия и истинная полицитемия) и 50 детей с геморрагическими состояниями неустановленного генеза. Большому числу пациентов (n = 126) для подтверждения диагноза были проведены

генетические исследования с помощью панели «Гемостаз», включающей 134 гена. Больные были разделены на несколько подгрупп в зависимости от числа тромбоцитов и их размера: нормоклеточные НЗТ; нормотромбоцитопении, микротромбоцитопении (синдром Вискотта-Олдрича), макротромбоцитопении, тромбоцитемии, и геморрагические состояния неуточненного генеза. Всем больным кроме стандартных тестов (измерение количества тромбоцитов и их агрегации) было выполнено исследование тромбоцитов с помощью проточной цитометрии. Проводился анализ, как не активированных тромбоцитов, так и тромбоцитов, активированных сочетанием двух мощных индукторов (пептид активирующий рецептор тромбина и коллагеноподобный пептид). Для обоих состояний тромбоцитов измеряли их прямое и боковое светорассеивание для оценки размера и гранулярности соответственно. Флуоресцентно меченные антитела и некоторые другие маркеры были использованы для измерения экспрессии главных адгезивных рецепторов тромбоцитов (гликопротеинов (ГП) IIb-IIIa (CD61/41) и ГП Ib (CD42b)), регистрации появления на поверхности активированных тромбоцитов активной формы ГП IIb-IIIa, маркера экзоцитоза альфа-гранул, CD62P (P-селектина) и коагуляционно активного фосфатидилсерина, а также для оценки накопления и высвобождения из плотных гранул специфического маркера мепакрина. Таким образом, эти подходы позволяли анализировать морфологические и структурные характеристики тромбоцитов (показатели светорассеивания, окраска плотных гранул), содержание отдельных белков на их поверхности, и широкий спектр их функциональных активностей (активация ГП IIb-IIIa, экзоцитоз плотных и альфа-гранул, фосфатидилсерин-зависимый коагуляционный потенциал тромбоцитов). С помощью метода проточной цитометрии автором не только проводилась успешная диагностика отдельных форм НЗТ, но были выявлены некоторые новые нарушения у больных с известными нозологиями. Так при активации тромбоцитов было обнаружено снижение уровня CD62P у больных с тромбастенией Гланцмана, снижение уровня фосфатидилсерина у больных с синдромом Германского-Пудлака, ослабление отщепления ГП Ib, и активации ГП IIb-IIIa у больных с синдромом Вискотта-Олдрича. Благодаря включению большого количества больных, была сделана попытка найти некоторые общие закономерности изменений свойств тромбоцитов в отдельных подгруппах пациентов, и в частности те из них, которые могут быть ассоциированы с риском кровотечений. Особо актуальна эта задача была для подгруппы больных с геморрагическим синдромом неуточненного генеза. У значительного количества детей в этой подгруппе (38%) наблюдался характерных комплекс нарушений, включавший повышенную гранулярность, повышение CD62P в покое и снижение после активации и снижение фосфатидилсерина после активации. Более

того, низкие количества фосфатидилсерина на поверхности активированных тромбоцитов были ассоциировано с повышенным уровнем кровотечений. Совокупность полученных автором результатов (разработка и апробации предложенного метода проточной цитометрии, выявление новых характеристик известных НЗТ и новых маркеров, ассоциированных с кровотечениями) научно и клинически значима и удовлетворяет требованиям, предъявляемым к кандидатской диссертации по специальности 3.1.28. «Гематология и переливание крови».

Достоверность полученных данных базируется на достаточном для анализа количестве пациентов в каждой выделенной подгруппе больных, адекватности методов исследования поставленным в работе задачам и корректной статистической обработке данных. Выводы и практические рекомендации соответствуют полученным результатам.

По материалам диссертации опубликовано 10 статей в журналах из списка ВАК, и, в том числе 3 работы в рейтинговых международных журналах («Platelets», «Clinica Chimica Acta»). Также материалы работы были неоднократно представлены на международных и отечественных научных конференциях (10 тезисов).

Автореферат написан в хорошем стиле, материал логично изложен и хорошо иллюстрирован. Количество стилистических неточностей и опечаток минимально.

Вопросы и замечания по работе

- (1) При активации тромбоцитов автором были использованы высокие концентрации сильных индукторов тромбоцитов (пептид активирующий рецептор тромбина + коллагеноподобный пептид). Не могло ли это привести к недостаточной чувствительности метода для регистрации умеренных нарушениям функциональной активности тромбоцитов, например, связанных с дефектами АДФ- и тромбоксан А2-зависимой активации (патологии рецепторов и/или соответствующих сигнальных путей)?
- (2) Для интегральной оценки морфологии тромбоцитов автором предложено использовать отношение прямого к боковому светорассеиванию тромбоцитов (FSC/SSC). Показатель прямого светорассеивания коррелирует с размером, а показатель бокового светорассеивания зависит от степени гранулярности тромбоцитов. Однако у больных с синдромом Германского-Пудлака, характеризующегося дефицитом плотных гранул тромбоцитов, это отношение не снижается по сравнению со здоровыми пациентами, а даже несколько повышается. Как можно объяснить этот результат?
- (3) В качестве замечаний по тексту автореферата можно отметить досадную неточность в третьем выводе – «...ослабление растворения ГП Ib» вместо ослабление отщепления ГП Ib, а в четвертом выводе отсутствие уточнения подгрупп больных, у

которых тяжесть геморрагического синдрома была ассоциирована с низкой экспрессией фосфатидилсерина.

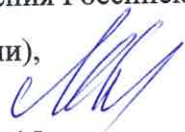
Следует отметить, что вопросы имеют дискуссионную направленность, а замечания носят формальный характер. Они нисколько не снижают актуальность и значимость полученных автором результатов.

Автореферат диссертации оформлен в соответствии с требованиями Высшей аттестационной комиссии (ВАК) при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, предъявляемыми к диссертационным работам. На основании автореферата можно делать вывод о том, что диссертация Полохова Дмитрия Михайловича «Диагностика нарушений функции тромбоцитов у детей с использованием метода проточной цитометрии» представляет собой законченное научно-квалификационное исследование, в котором решена актуальная медико-биологическая задача по изучению структуры и функции тромбоцитов у детей с генетическими нарушениями тромбоцитарного гемостаза. Работа отвечает требованиям п.9 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013г. (с изменениями в редакции постановлений Правительства Российской Федерации №335 от 21.04.2016 г., № 748 от 02.08.2016г.), предъявляемых к диссертациям на соискание ученой степени кандидата медицинских наук, а ее автор Полохов Дмитрий Михайлович заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 3.1.28. «Гематология и переливание крови».

27 апреля 2023 г.

Главный научный сотрудник, и.о. руководителя лаборатории клеточной адгезии
Института экспериментальной кардиологии
ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. академика
Е.И. Чазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации
(«НМИЦ кардиологии» Минздрава России),

доктор медицинских наук, профессор
121552 г. Москва, ул. Академика Чазова, д.15а

 Мазуров Алексей Владимирович

Подпись Мазурова А.В. заверяю

Ученый секретарь Института экспериментальной кардиологии
«НМИЦ кардиологии» Минздрава России,

доктор медицинских наук

 Плеханова Ольга Сергеевна